

## PRODUCTION OF GLYCOSYLVITAMIN

**Publication number:** JP56156299 (A)

**Publication date:** 1981-12-02

**Inventor(s):** MIYAKE TOSHIO

**Applicant(s):** HAYASHIBARA BIOCHEM LAB

**Classification:**


- international: *C12P19/60; C07H15/04; C07H17/06; C07H17/07; C07H19/20; C12P19/44; C07H15/00; C07H17/00; C07H19/00; C12P19/00; (IPC1-7): C07H15/04; C07H17/06; C07H19/20*


- European:

**Application number:** JP19800059919 19800508

**Priority number(s):** JP19800059919 19800508

**Also published as:**

 JP58054799 (B)

 JP1222288 (C)

### Abstract of JP 56156299 (A)

**PURPOSE:**An aqueous solution of glycosyvitamin containing water-soluble saccharide is brought into contact with a porous synthetic adsorbent to selectively adsorb the above vitamin used as an enhancer for food, beverage and cosmetics and as a medicine, thus effecting purification with industrial advantage. **CONSTITUTION:**For example, a vitamin such as vitamin B2 or P and a saccharide with glycoside linkages are dissolved in water and treated with a saccharide transferase such as cyclodextrin glucanotransferase (E.C.2.4.19). The resultant glucoside vitamin aqueous solution containing water-soluble saccharide is brought into contact with a porous synthetic adsorbent such as a porous nonionic resin made from a styrene-divinylbenzene copolymer, preferably by the column method to adsorb the glycosylvitamin and untreated vitamin.; They are eluted with an aqueous alcohol, concentrated and dried to give the objective substance.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—156299

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 H 15/04  
17/06  
19/20

識別記号

庁内整理番号  
7252—4C  
7252—4C  
7252—4C

⑭ 公開 昭和56年(1981)12月2日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑮ グリコシルビタミンの製造方法

⑯ 発明者 三宅俊雄

岡山市奉還町3丁目1番16号

⑰ 特 願 昭55—59919

⑰ 出 願 人 株式会社林原生物化学研究所

⑱ 出 願 昭55(1980)5月8日

岡山市下石井1丁目2番3号

明 細 書

1. 発明の名称

グリコシルビタミンの製造方法

2. 特許請求の範囲

水溶性糖類を含有しているグリコシルビタミン水溶液を多孔性合成吸着剤に接触せしめて多孔性合成吸着剤にグリコシルビタミンを吸着させ、その多孔性合成吸着剤からグリコシルビタミンを溶出採取することを特徴とするグリコシルビタミンの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、水溶性糖類を多量に含有しているグリコシルビタミン水溶液を多孔性合成吸着剤に接触せしめて多孔性合成吸着剤にグリコシルビタミンを吸着させ、その多孔性合成吸着剤からグリコシルビタミンを溶出採取することを特徴とするグリコシルビタミンの製造方法に関するものである。

グリコシルビタミンは、ビタミンに糖が結合した水溶性の大きいビタミンであって、例えば、ビタミンとグリコシド結合を有する糖類とを含有す

る水溶液に糖転移酵素を反応させて製造されるグリコシルビタミン B<sub>2</sub> (別名 リボフラビニルグリコシド)、グリコシルビタミン P (別名 ルチングリコシド、エスクリングリコシド) などがある。

しかしながら、このようにして調製されるグリコシルビタミン含有反応物には、グリコシルビタミンと共に反応時に基質 (糖供与体) として使用したグリコシド結合を有する糖類およびその分解物などの水溶性糖類が多量に共存している。

このようなグリコシルビタミン含有反応物から水溶性糖類を分離、除去して、高純度のグリコシルビタミンを製造する方法としては、例えば、特公昭48—19957号公報に開示されているハイドロサルファイト還元沈澱法によるグリコシルビタミン B<sub>2</sub> の製造方法、或は特公昭54—32073号公報に開示されている塩基性酢酸鉛沈澱法によるグリコシルビタミン P の製造方法などある。

しかしながら、これらの方法は、何れも多量の薬品を消費するだけでなく、操作も繁雑で、工業的な実施は困難であった。

本発明者は、水溶性糖類を多量に含有しているグリコシルビタミン水溶液から、グリコシルビタミンを容易に採取することを目的に鋭意検討した。

その結果、多孔性スチレンージビニルベンゼン重合樹脂のような多孔性合成吸着剤が、多量に共存する水溶性糖類を吸着せずにグリコシルビタミンを選択的に吸着することを見いだすと共に、グリコシルビタミンを吸着した多孔性合成吸着剤に有機溶媒を接触せしめることによってグリコシルビタミンを容易に溶出し採取できることを確認して本発明を完成した。

本発明で言うグリコシルビタミン $B_2$ とは、ビタミン $B_2$ に糖が結合した物質であって、例えば、リボフラビニルグルコシド、リボフラビニルマルトシド、リボフラビニルイソマルトシド、リボフラビニルガラクトシドなどを言う。また、グリコシルビタミンPとは、ビタミンPに糖が結合した物質であって、例えば、ルチングルコシド、ルチンマルトシド、エスクリングルコシド、エスクリンマルトシド、エスクリンマルトトリオシドなどを

- 3 -

本発明を具体的に述べれば、例えば、特公昭52-28844号公報、特公昭54-32073号公報などに開示されているように、ビタミン $B_2$ 、ビタミンPなどのビタミンとグリコシド結合を有する糖類とを含有する水溶液にシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(E.C. 2.4.1.19)、 $\alpha$ -アミラーゼ(E.C. 3.2.1.1)、 $\alpha$ -グルコシダーゼ(E.C. 3.2.1.20)などの糖転移酵素を反応させグリコシルビタミンを生成し、必要に応じてその反応液を、例えばケイ酸アルミン酸マグネシウム、アルミン酸マグネシウムなどで処理して反応液中の蛋白質などの夾雑物を吸着、除去したり、強酸性イオン交換樹脂(H型)および弱塩基性イオン交換樹脂(OH型)で処理して脱塩する。

このようにして調製されたグリコシルビタミンを含有する水溶液を、多孔性合成吸着剤を充填したカラムに通液すると、グリコシルビタミンおよび未反応のビタミンが見事に吸着されるのに対し、多量に共存する水溶性糖類は吸着されことなく

- 5 -

言う。

本発明で言う多孔性合成吸着剤とは、スチレンージビニルベンゼン重合樹脂のような多孔性で非イオン性の合成吸着剤であって、例えば、市販されているRohm & Haas社製造の商品名アンバーライトXAD-1、アンバーライトXAD-2、アンバーライトXAD-4、アンバーライトXAD-7、アンバーライトXAD-8、アンバーライトXAD-9、アンバーライトXAD-11、アンバーライトXAD-12、三菱化成工業株式会社製造の商品名ダイヤイオンHP-10、ダイヤイオンHP-20、ダイヤイオンHP-30、ダイヤイオンHP-40、ダイヤイオンHP-50、IMACTI社製造の商品名イマクテイSyn-42、イマクテイSyn-44、イマクテイSyn-46などがある。

また、本発明において、これら多孔性合成吸着剤を接触させる方法としては、パッチ法によってもよいが、大量生産する場合には多孔性合成吸着剤を充填したカラムに通液する連続法が適している。

- 4 -

そのまま流出する。

次いで、このグリコシルビタミンおよび未反応のビタミンを吸着した多孔性合成吸着剤を希アルカリ水、水などで洗浄した後、比較的少量の有機溶媒、または有機溶媒と水との混合液、例えば、メタノール水、エタノール水などを通液すれば、水溶性糖類と分離、吸着されたグリコシルビタミンおよび未反応のビタミンが溶出してくる。この溶出液を蒸溜して、先づ有機溶媒を除去した後、適当な濃度にまで濃縮してシラップ状のグリコシルビタミン製品が得られる。さらに、このシラップ状のグリコシルビタミン製品を乾燥し、粉末化することによってグリコシルビタミンの粉末製品が得られる。

この有機溶媒によるグリコシルビタミン及び未反応ビタミンの溶出操作は、同時に使用した多孔性合成吸着剤の再生操作にもなるので、この多孔性合成吸着剤の繰り返し使用を可能にする。

また、本発明による時は、水溶性糖類だけでなく、塩類などの夾雑物も同時に除去することがで

- 6 -

きる特徴をも有する。

このようにして得た本発明により製造されたグリコシルビタミンは、

- (1) 水溶性がきわめて大きい。
- (2) 耐光性、安定性が大きい。
- (3) 苦味が少ない。
- (4) 体内の酵素により糖とビタミンとに加水分解され、ビタミンとしての生理活性を示す。

などの特徴を有していることから、例えば、飲食品、飼料、餌料の強化用ビタミン剤として、また化粧品配合剤として、さらにはうがい薬、点眼薬、点鼻薬、内服薬、注射薬など医薬品の配合剤などとして有利に利用することができる。

特に、グリコシルビタミン $B_2$ の場合には、水溶性の黄色食用色素としても利用することができ、さらには水溶性の食用配合色素、例えば、グリコシルビタミン $B_2$ と水溶性の食用色素青色1号とを配合して、従来得られなかった水溶性の食用緑色色素を容易に調製するなど他の水溶性食用色素と容易に配合することができる。

- 7 -

5 mlに適当に希釈した酵素液(ml当り約1~2単位) 0.2 mlを加え、40℃で10分間反応させた後、その反応液 0.5 mlをとり、0.02 N-硫酸水溶液 15 mlに混合して反応を停止させ、さらにこの反応停止液に 0.1 Nヨウ素ヨウ化カリウム溶液 0.2 mlを加えて発色させ、次いで660 nmにおける吸光度を測定して、40℃で10分間反応させることによりソリュブルスターチ 15 mgのヨウ素呈色を完全に消失させる酵素量を言う。

#### (1-2) グリコシルビタミン $B_2$ の製造

リボフラビン 2.5 g、D.E. 18のデキストリン

500 gを1,600 mlの水に加熱溶解した後、温度を60℃に冷却し、次いで実施例(1-1)で調整した粗シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ標品 1,000単位を加え、pH 6.0、温度60℃に保ちつつ20時間反応させた。反応液をペーパークロマトグラフィーで分析したところ、リボフラビンの65%がリボフラビニルグリコシド(グリコシルビタミン $B_2$ )に転換していた。この反応液を温度95℃に10分間保って酵素を失

- 9 -

次に、2~3の実施例について述べる。

#### 実施例 1.

##### (1-1) 転移酵素(シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ)の調整

バチルス ステアロサーモフィラス(Bacillus stearothermophilus) FERM-P No 2222を、ソリュブルスターチ 2 w/v%、硝酸アンモニウム 1 w/v%、リン酸2カリウム 0.1 w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩 0.05 w/v%、コーンスティーブリカー 0.5 w/v%、炭酸カルシウム 1 w/v%、水からなる殺菌した液体培地 10 Lに植菌して、50℃で3日間通気攪拌培養した。得られた培養液を遠心分離して、その上清を硫酸 0.7飽和で塩析し、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(E.C. 2.4.1.19)の活性約80,000単位を有する粗酵素標品を得た。

ここで言う活性1単位とは、pH 5.5、0.02 Mの酢酸緩衝液および $2 \times 10^{-3}$  Mの塩化カルシウムを含む 0.3 w/v%のソリュブルスターチ溶液

- 8 -

活させた後、室温にまで冷却し、これにケイ酸アルミン酸マグネシウム顆粒(富士化学工業株式会社製造の商品名 ノイシリン) 1 gを加えて、時々攪拌しつつ30分間保った後、吸引濾過して酵素標品由来の蛋白質などの夾雑物を吸着除去した。

得られた濾液を多孔性合成吸着剤(Rohm & Haas社製造の商品名 アンバーライト XAD-7) 5 Lを充填したガラス製カラムにSV 2で通液した。その結果、溶液中のリボフラビニルグリコシドおよび未反応のリボフラビンは、その多孔性合成吸着剤に吸着し、デキストリン、オリゴ糖、塩類などは吸着することなく流出した。

次いで、このリボフラビニルグリコシドおよび未反応のリボフラビンを吸着した多孔性合成吸着剤を水30 Lで洗浄した後、50 v/v%のメタノール10 Lを通液し、リボフラビニルグリコシドおよびリボフラビンを溶出した。

この溶出液を減圧蒸溜してメタノールを除き、さらに濃縮した後、減圧乾燥し粉末化して粉末

- 10 -

状橙黄色のグリコシルビタミン B<sub>2</sub>製品約 3.5 g を得た。

本品は、多量のリボフラビニルグリコシドを含有しているので冷水にもきわめて容易に溶け、しかも耐光性に優れ、苦味も少ないので、各種飲食品、化粧品、医薬品などへのビタミン B<sub>2</sub>強化剤、さらには水溶性の食用着色料などとして好適に利用し得る。

## 実施例 2.

### (2-1) 転移酵素(α-グルコシダーゼ)の調整

マルトース 4 w/v %, リン酸 1 カリウム 0.1 w/v %, 硝酸アンモニウム 0.1 w/v %, 硫酸マグネシウム 0.05 w/v %, 塩化カリウム 0.05 w/v %, ポリペプトン 0.2 w/v %, 炭酸カルシウム 1 w/v % (別に乾熱滅菌して植菌時に無菌的に添加した) および水からなる液体培地 500 ml にムコール ジャバニカス (Mucor javanicus) IFO 4570 を温度 30℃ で 44 時間振盪培養した。培養終了後、菌体を採取し、その湿菌体 48 g に対し 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3)

- 11 -

て酵素製品由来の蛋白質などの夾雑物を吸着、除去した。

得られた汁液を多孔性合成吸着剤 (三菱化成工業株式会社製造の商品名 ダイヤイオン HP-20) 2 L を充填したステンレス製カラムに SV 2 で通液した。その結果、溶液中のリボフラビニルグリコシドおよび未反応のリボフラビンは、その多孔性合成吸着剤に吸着し、デキストリン、オリゴ糖、グルコースなどの水溶性糖類および塩類などは、吸着することなく流出した。

次いで、このリボフラビニルグリコシドおよび未反応のリボフラビンを吸着した多孔性合成吸着剤を水 10 L で洗浄した後、20 v/v % のエタノール 5 L を通液し、リボフラビニルグリコシドおよびリボフラビンを溶出した。

この溶出液を実施例 (1-2) の場合と同様に減圧蒸留してエタノールを除き、さらに濃縮、乾燥、粉末化して粉末状橙黄色のグリコシルビタミン B<sub>2</sub>製品約 1.5 g を得た。

本品は、実施例 (1-2) で得た製品と同様に、

- 13 -

に溶解した 4 M 尿素液 500 ml を加え、温度 30℃ で 40 時間静置した後、遠心分離した。この上澄液を流水中で一夜透析した後、硫酸 0.9 飽和とし、温度 4℃ で一夜放置して生成した塩析物を採取し、0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 50 ml に懸濁溶解した後、遠心分離して上澄液を粗 α-グルコシダーゼ製品とした。

### (2-2) グリコシルビタミン B<sub>2</sub>の製造

リボフラビン 1 g、D.E. 10 のデキストリン 100 g を 950 ml の水に加熱溶解した後、温度 50℃ に冷却し、次いで実施例 (2-1) で調整した粗 α-グルコシダーゼ製品 40 ml を加え、pH 8.0、温度 50℃ に保ちつつ 40 時間反応させた。反応液をペーパークロマトグラフィーで分析したところ、リボフラビンの 88% がリボフラビニルグリコシド (グリコシルビタミン B<sub>2</sub>) に転換していた。

この反応液を温度 95℃ に 10 分間保って α-グルコシダーゼを失活させた後、実施例 (1-2) と同様にケイ酸アルミン酸マグネシウムで処理し

- 12 -

各種飲食品、化粧品、医薬品などへのビタミン B<sub>2</sub>強化剤、さらには水溶性の食用着色料などとして好適に利用し得る。

## 実施例 3. グリコシルビタミン B<sub>2</sub>の製造

リボフラビン 2 g、ラクトース 100 g を 0.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.8) 900 ml に加熱溶解した後、温度 30℃ に冷却し、これに転移酵素液 2,000 ml (ニュートリショナル バイオケミカルズ社製の β-ガラクトシダーゼ 2,000 mg を含む) を混合して、これを温度 30℃ で 16 時間反応させた。

反応液をペーパークロマトグラフィーで分析したところ、リボフラビンの 23% がリボフラビニルグリコシド (グリコシルビタミン B<sub>2</sub>) に転換していた。

この反応液を 1,000 ml に濃縮した後、終末 2% となるように過塩素酸を加え、遠心分離して蛋白質を除去した。その上澄液を 1 N-カセイソーダ液にて pH 5.0 に中和して 200 ml まで濃縮し、次いで徐々に攪拌しつつ冷却し最終 4℃ にまで

- 14 -

下げ16時間保った。この溶液中に晶出したリボフラビンを遠心分離して除去し、得られる上澄をイオン交換樹脂アンバーライト I R - 200 (H型) およびアンバーライト I R - 68 (OH型) をそれぞれ 200 ml づつ用いてイオン交換し脱塩した。

この脱塩液を多孔性合成吸着剤 (IMACTI 社製造の商品名 イマクティ Syn-42) 2 L を充填したカラムに SV 2 で通液し、リボフラビニルグリコシドおよび溶解残留するリボフラビンを吸着させ、ラクトース、グルコース、ガラクトースなどの水溶性糖類と分離した後、実施例 (2-2) と同様にエタノール水にてリボフラビニルグリコシドとリボフラビンとを溶出し、濃縮、乾燥、粉末化して粉末状橙黄色のグリコシルビタミン B<sub>2</sub> 製品約 0.8 g を得た。

本品は、実施例 (1-2) で得た製品と同様に、各種飲食物、化粧品、医薬品などへのビタミン B<sub>2</sub> 強化剤、さらには水溶性の食用着色料などとして好適に利用し得る。

- 15 -

び未反応のルチンは、その多孔性合成吸着剤に吸着し、デキストリン、オリゴ糖、塩類などは吸着することなく流出した。

次いで、このルチングリコシドおよび未反応のルチンを吸着した多孔性合成吸着剤を水 20 L で洗浄した後、30 v/v 名のエタノール 8 L を通液してルチングリコシドおよびルチンを溶出し、さらに実施例 (1-2) の場合と同様に濃縮、乾燥、粉末化して粉末状のグリコシドビタミン P 製品約 4 g を得た。

本品は、多量のルチングリコシドを含有しているので、冷水にもきわめて容易に溶け、しかも安定性に優れており、苦味も少ないので各種飲食物、化粧品、医薬品などへのビタミン P 強化剤、さらには日焼け止め化粧品などへの配合剤として好適に利用し得る。

#### 実施例 5. グリコシルビタミン P の製造

エスクリーン 3 g、D.E. 20 のデキストリン 400 g を 2,000 ml の水に加熱溶解した後、温度 60℃ に冷却し、次いで実施例 (1-1) の方法

#### 実施例 4. グリコシルビタミン P の製造

ルチン 2 g、D.E. 18 のデキストリン 300 g を 1,800 ml の水に加熱溶解した後、温度 60℃ に冷却し、これに実施例 (1-1) の方法で調整した粗シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ標品 1,000 単位を加えて、pH 6.0、温度 60℃ に保ちつつ 16 時間反応させた。反応液をペーパークロマトグラフィーで分析したところ、ルチンの 93% がルチングリコシド (グリコシルビタミン P) に転換していた。

この反応液を実施例 (1-2) と同様に加熱して酵素を失活させた後、アルミン酸マグネシウム粉末 (北海道曹達株式会社製造の商品名 吸着剤 M-511) 1 g を加えて攪拌しつつ 20 分間保った後、濾過して酵素標品由来の蛋白質などの夾雑物を吸着除去した。

得られた濾液を多孔性合成吸着剤 (Rohm & Haas 社製造の商品名 アンバーライト XAD-2) 4 L を充填したガラス製カラムに SV 3 で通液した。その結果、溶液中のルチングリコシドおよ

- 16 -

で調整した粗シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ標品 1,000 単位を加えて、pH 6.0、温度 60℃ に保ちつつ 20 時間反応させた。反応液をペーパークロマトグラフィーで分析したところ、エスクリンの 91% がエスクリングリコシド (グリコシルビタミン P) に転換していた。この反応液を実施例 (1-2) と同様に加熱して酵素を失活させ、ケイ酸アルミン酸マグネシウム顆粒 (富士化学工業株式会社製造の商品名 ノイシリン) 2 g を加えて攪拌しつつ 30 分間保った後、濾過して酵素標品由来の蛋白質などの夾雑物を吸着除去した。

得られた濾液を多孔性合成吸着剤 (三菱化成工業株式会社製造の商品名 ダイアイオン HP-50) 4 L を充填したカラムに SV 2 で通液した。その結果、溶液中のエスクリングリコシドおよび未反応のエスクリンは多孔性合成吸着剤に吸着し、デキストリン、オリゴ糖などの水溶性糖類、および塩類などは吸着することなく流出した。

- 18 -

次いで、実施例4と同様にエスクリングリコシドおよびエスクリンを吸着した多孔性合成吸着剤から、エスクリングリコシドおよびエスクリンを溶出し、濃縮、乾燥、粉末化して粉末状のグリコシドビタミンP製品約5gを得た。

本品は、多量のルチングリコシドを含有しているので、冷水にもきわめて容易に溶け、しかも安定性に優れており、苦味も少ないので各種飲食品、化粧品、医薬品などへのビタミンP強化剤、さらには日焼け止め化粧品などへの配合剤などとして好適に利用し得る。

特許出願人

株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原



## 特許法第17条の2の規定による補正の掲載

手 続 補 正 書

昭和57年3月31日

昭和55年特許願第59919号(特開昭56-156299号 昭和56年12月2日発行 公開特許公報56-1563号掲載)については特許法第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。

特許庁長官 島 田 春 樹 殿

Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号
C07H 15/04		7252-4C
17/06		7252-4C
19/20		7252-4C

## 1. 事件の表示

昭和55年特許願第59919号

## 2. 発明の名称

グリコシルビタミンの製造方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原

健

## 4. 補正の対象

明細書における「発明の詳細な説明」の項

## 5. 補正の内容

- (1) 明細書第3頁第11行記載の「…本発明を完成した。」の後、次文を挿入します。

「ただし、本発明は、グリコシルビタミンのうち、特公昭48-38158号公報記載のアスコルビン酸グリコシドの採取には有効でなかった。」

- (2) 明細書第4頁第2～4行記載の「本発明で言う……合成吸着剤であって、」を「本発明で言う多孔性合成吸着剤とは、多孔性で広い吸着表面積を有し、かつ非イオン性のステレンージビニルベンゼ共重合体、フェノールホルマリン樹脂、アクリレート樹脂、メタアクリレート樹脂などの合成樹脂であり、」に補正します。

- (3) 明細書第6頁第7～11行記載の「水溶性糖類と分離、……得られる。」を「水溶性糖類と分離され、まづグリコシルビタミンが溶出し、通液量を増すか有機溶媒濃度を高めるかすれば未反応のビタミンが溶出してくる。このグリコシルビタミン高含有溶出液を蒸留して、先ず有機溶媒を溜去した後、適当な濃度にて濃縮し

てグリコシルビタミンを主成分とするシラップ状製品が得られる。」に補正します。

- (4) 同頁第13行記載の「グリコシルビタミンの粉末製品」を「グリコシルビタミンを主成分とする粉末製品」に補正します。

- (5) 明細書第15頁第5行記載の「200 mlづつ」を「200 mlずつ」に補正します。

- (6) 明細書第17頁第18行記載の「エスクリーン」を「エスクリン」に補正します。